

フェノール資化性酵母に関する研究

赤木盛郎・森 幸彦*
山田哲也**・中尾孝子

Studies on Phenol Metabolizing Yeasts

Morio AKAKI, Sachihiko MORI,*
Tetsuya YAMADA** and Takako NAKAO

緒 言

フェノール、フェノール類縁物質には、生物に対して有毒な物質が多い。有毒な有機化合物を含んだ工場廃液を生物によって分解処理することは活性汚泥法によって行われている。フェノール類縁物質については、活性汚泥に含まれる微生物のうち細菌に関する研究¹⁾が多く、酵母菌については根井ら²⁻⁴⁾による *Rhodotorula glutinis*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon cutaneum* についての報告、伊藤ら⁵⁻⁷⁾による *Trichosporon cutaneum* についての報告、赤木ら⁸⁾による報告が見当る程度である。本報では筆者らにより分離、選択、同定されたフェノール資化性の強い *Candida tropicalis* 6263株, X-12株, N-13株, S-IV-1株の4株を用いて、フェノール類縁物質の酸化活性を中心に検討したので報告する。

供試菌株および実験方法

1. ワールブルグ検圧計によるフェノール類縁物質の酸化活性の測定

フェノール類縁物質の酸化活性を測定することは、酸化活性の菌株による相異、基質による相異、前培養培地組成の相異などを分りやすくし、またその酸化パターンを知ることはフェノール含有廃水の生物処理に有用と考えられる。

1) 供試菌株

フェノール資化性酵母 *Candida tropicalis* 6263株, X-12株, N-13株, S-IV-1株の4株を用いた。これらの菌株は、フェノールを炭素源とする培地によく生育するものとして選択された菌株である。X-12株はキシロース資化性酵母, N-13株は漬物から分離された耐塩性の酵母,

* プリマハム KK
** 三重大学

S-IV-1株はアルコール蒸留廃液から分離された酵母で、これら3株は何れも *Candida tropicalis* と同定されている。⁸⁾

2) 酵母の培養方法

前培養は Table 1 に示した YM 培地および YM フェノール培地 (YMP) を用いた。YM 培地 25ml を 100ml 容三角フラスコに分注し、120℃、20分殺菌した。YM フェノール培地はオートクレーブ後の YM 培地に 2% フェノール水溶液を殺菌ピペットで添加し、フェノール濃度 0.06% としたものである。これらの培地に新鮮な YM 斜面培養から 1 白金耳接種し、回転振とう機 (135rpm) により 30℃、15~24時間振とう培養を行った。この前培養菌体を無菌水で洗浄後、遠心分離 (8000rpm, 5分) して菌体を集め検圧法による試験に供した。

Table 1. Composition of media for preculture.

	YM	YMP
Glucose	1.0%	1.0%
Polypeptone	0.5	0.5
Malt extract	0.3	0.3
Yeast extract	0.3	0.3
Phenol	—	0.06
pH	6.5	6.5

Table 2. Composition of medium for utilization test of various phenols.

	Content (%)
NH ₄ Cl	0.5
KH ₂ PO ₄	0.25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.1
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.001
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.001
Yeast extract	0.01
Various phenols	0.01~0.1
Silicone oil	0.02
Tween 80	0.0025
pH	6.0

種々のフェノール類縁物質の資化実験では、前培養培地として Table 1 に示した YM 培地を、生育培地として伊藤ら⁵⁾の、フェノール類縁物質を 0.01~0.1% 含有する無機塩培地 (Table 2) を用いた。100ml 容三角フラスコに YM 培地 25ml をとり殺菌後、新鮮な YM 斜面培養から 1 白金耳接種した。回転振とう機により 30℃、12時間振とう培養を行った。前培養菌体を無菌水で洗浄後、遠心分離 (8000rpm, 5分) して菌体を集め、25ml の無菌水に懸濁させ、フェノール類縁物質を 0.01~0.1% 含む無機塩培地 10ml を入れた培養用試験管 (3×20cm) にこの菌懸濁液を殺菌ピペットで 3 滴加え、往復振とう機 (振巾 12cm, 155 往復/分) により 28℃、最高

5日間振とう培養を行った。なお、生育培地としての無機塩培地には、消泡剤としてシリコンオイル0.02%, Tween80を0.0025%添加した。菌の生育は肉眼で判定し, #; Abundant growth, +; Moderate growth, ±; Poor growth, -; No growthの4段階とした。

3) 検 圧 法

検圧はワールブルグ検圧計を使用して行った。前培養菌体を10mlの無菌水に懸濁した(菌体濃度は乾物として7~12mg/ml)。ワールブルグフラスコの主室には菌懸濁液1mlとM/15リン酸緩衝液(pH6.5)1mlを, 副室には30%水酸化カリウム溶液0.2mlを, 側室には試験基質の0.1%水溶液0.5mlを加え, 最終基質濃度が0.02%になるようにした。これら種々のフェノール類縁物質の試験には菌体を加えない対照フラスコも同時に振とうして, 試験基質の消費が揮発による消失や化学的酸化によらないことを確かめた。全て基質を用いない自家呼吸値を差し引いた。残りの菌懸濁液から乾燥菌体重量を求め, 乾燥菌体重量当たりの酸素吸収量を求めた。

さらに, 酸化活性測定時間を延長(80~140分)した実験(Fig.5)では, 前培養菌体を50mlの無菌水に懸濁し, 菌体濃度を低くし乾物として1.9~2.3mg/mlとして実験した。

実験結果並びに考察

1. ワールブルグ検圧計によるフェノール類縁物質の酸化活性の測定

Fig.1に *C. tropicalis* 6263株を使用した場合の実験結果を示した。

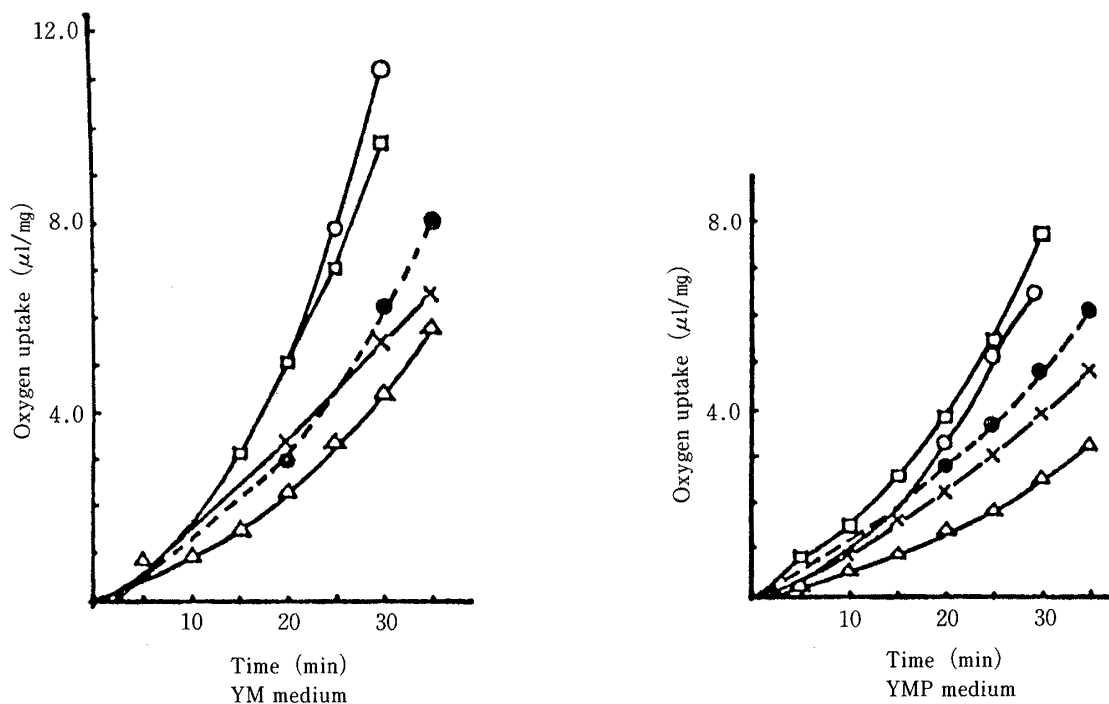


Fig. 1. Oxidation of various phenols by yeast (*C. tropicalis*).
phenol (●), catechol (□), resorcinol (△), hydroquinone (○), *p*-cresol (×)

Fig. 1 中、左の図は YM 培地で30℃、16時間培養したもの、右の図は YM フェノール培地で30℃、24時間培養したものである。YM 培地で培養したものと YM フェノール培地で培養したものとは、全体的にみて YM 培地で培養したものの方が30%程度酸化活性が高かった。基質については、いずれの培地でもヒドロキノンとカテコールが酸化されやすく、レゾルシンはもっとも酸化されにくかった。また、もっとも毒性が強いと思われる *p*-クレゾールがフェノールとともに中程度に酸化されたのは、0.02%程度の濃度では相対的な毒性はあまり問題にならなかったからではないかと思われる。なお、いずれの培地でも *p*-クレゾールの酸素吸収曲線は直線性を示した。

Fig. 2 に X-12株についての実験結果を示した。

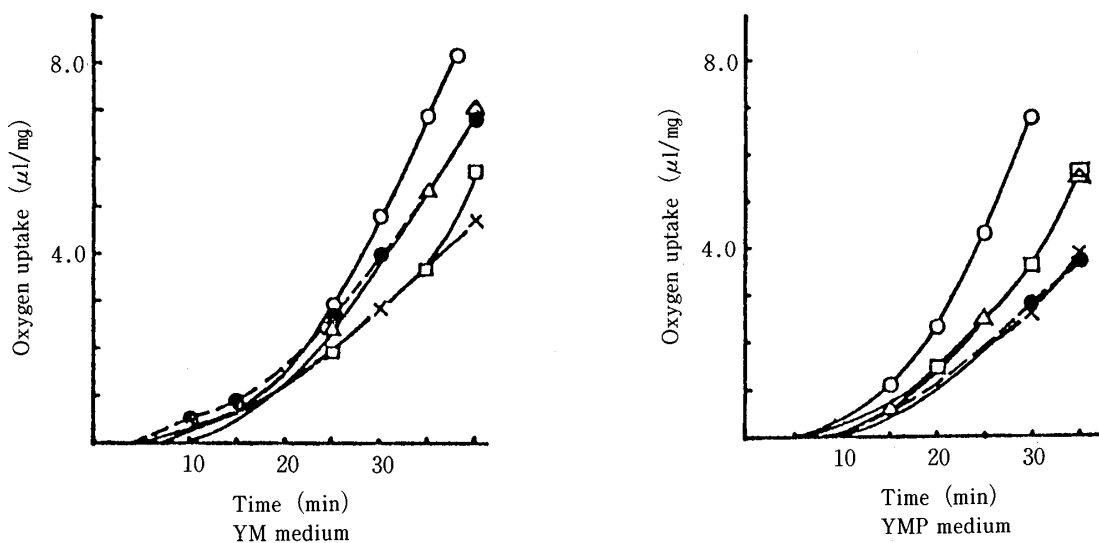


Fig. 2. Oxidation of various phenols by yeast (X-12).
phenol (●), catechol (□), resorcinol (△), hydroquinone (○), *p*-cresol (×)

Fig. 2 の左の図に YM 培地で30℃、15時間培養した場合の、右の図に YM フェノール培地で30℃、24時間培養した場合のフェノール類縁物質の酸素吸収量を示した。X-12株では YM 培地で培養したものでも、YM フェノール培地で培養したものでも、全体的にみて酸化活性はあまり変らなかった。基質については YM 培地ではヒドロキノン、レゾルシン、フェノールが、YM フェノール培地ではヒドロキノンが酸化されやすく、両培地とも *p*-クレゾールが酸化されにくかった。なお、両培地とも *p*-クレゾールの酸素吸収は直線性がみられた。

Fig. 3 に N-13株についての実験結果を示した。

Fig. 3 の左の図に YM 培地で30℃、15時間培養した場合の、右の図に YM フェノール培地で30℃、24時間培養した場合のフェノール類縁物質の酸素吸収量を示した。N-13株では *Candida tropicalis* 6263株と同じく、YM 培地で培養したものの方が YM フェノール培地で培養したものに比べ30%程度酸化活性が高かった。基質については、YM 培地では *p*-クレゾール、ヒドロキノン、フェノールが、YM フェノール培地ではヒドロキノンが酸化されやすく、両培地

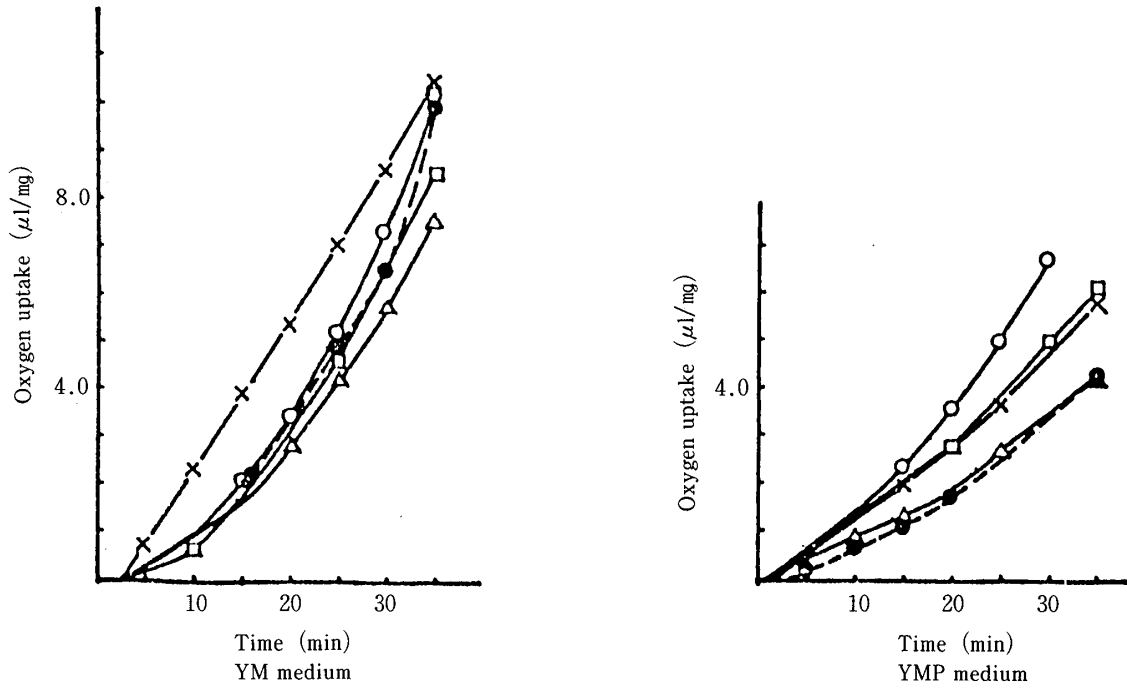


Fig. 3. Oxidation of various phenols by yeast (N-13).
phenol (●), catechol (□), resorcinol (△), hydroquinone (○), *p*-cresol (×)

ともレゾルシンが酸化されにくかった。なお *p*-クレゾールの酸素吸収曲線は何れも直線性を示した。

Fig. 4 に S-IV-1 株についての実験結果を示した。

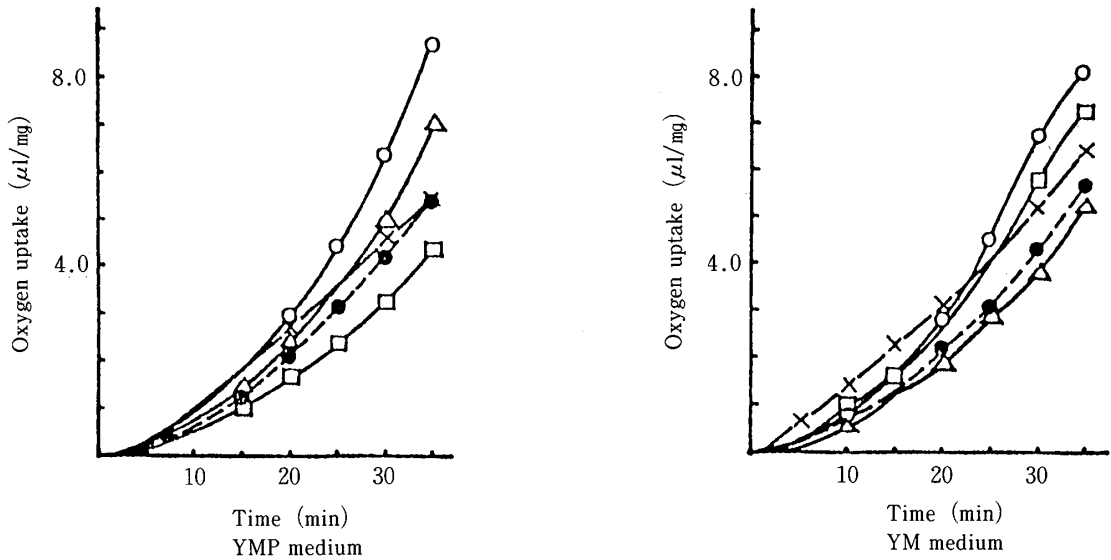


Fig. 4. Oxidation of various phenols by yeast (S-IV-1).
phenol (●), catechol (□), resorcinol (△), hydroquinone (○), *p*-cresol (×)

Fig. 4 の左の図に YM 培地で 30°C, 15 時間培養した場合の, 右の図に YM フェノール培地で 30°C, 24 時間培養した場合のフェノール類縁物質の酸素吸収量を示した。S-IV-1 株では X-12

株と同じく、YM 培地で培養したものでも YM フェノール培地で培養したものでも全体的にみて酸化活性はあまり変らなかった。基質については、YM 培地ではヒドロキノン、レゾルシンが酸化されやすく、カテコールが酸化されにくかった。YM フェノール培地ではヒドロキノン、カテコールが酸化されやすく、レゾルシンが酸化されにくかった。なお、*p*-クレゾールの酸素吸収曲線は何れも直線性を示した。

以上考察すれば、これらの結果から全般的にヒドロキノンがもっとも酸化されやすく、カテコールがそれに次ぎ、フェノール、レゾルシンはやや酸化されにくいことがわかった。また、*p*-クレゾールは中程度に酸化され、その酸素吸収曲線は直線性を示すことがわかった。また、*Candida tropicalis* 6263株と N-13株は YM 培地で培養したものの方が30%程度高い酸化活性を示した。これは YM 培地にフェノールを0.06%添加することによって生育が抑制され、YM フェノール培地培養のもの酸化活性が低くなったものと考えられる。これに対して X-12株、S-IV-1株がいずれの培地で培養したものでも酸化活性があまり変わらなかったのは、これらの菌株は0.06%のフェノール添加では生育は多少抑制されても酸化活性には悪影響を与えなかったものと考察される。

以上の実験では、酸化活性の測定時間を30~40分間としたが、他の文献などとの比較をも考え、菌懸濁液の濃度を下げ酸化活性測定時間を長くして(80~140分)実験を行った。使用菌株は S-IV-1株である。

実験結果を Fig. 5 に示した。

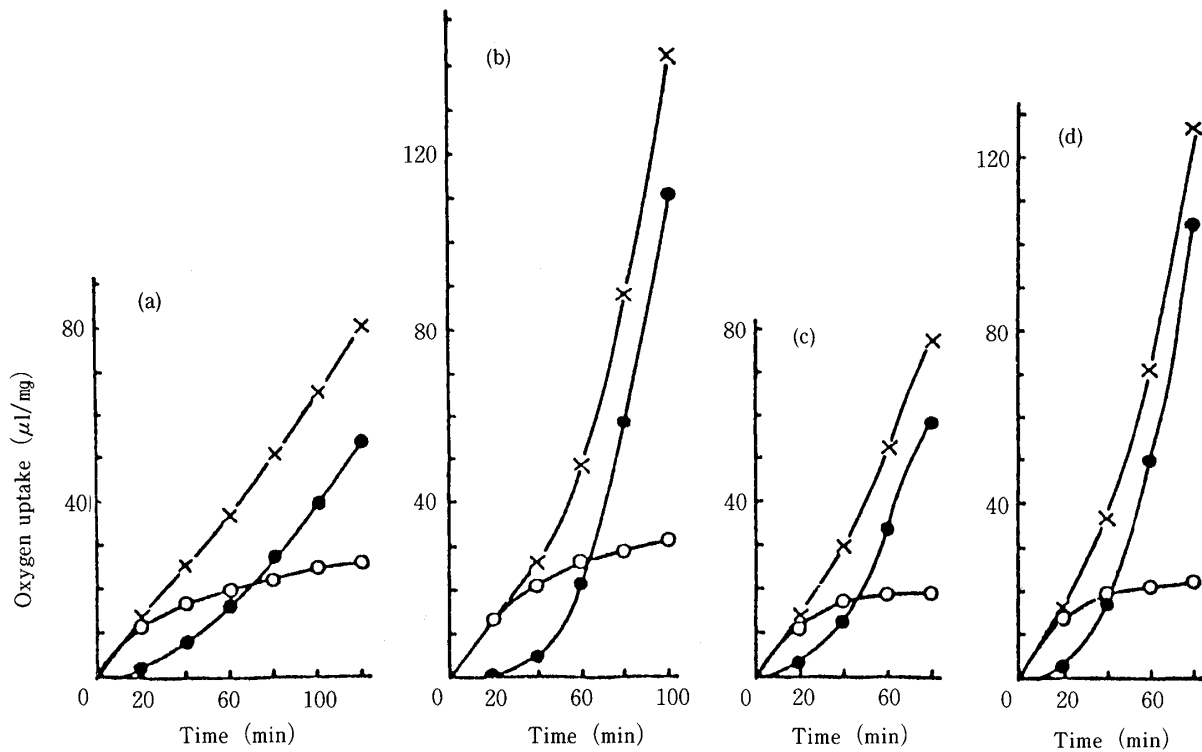


Fig. 5. Oxidation of phenol and dihydric phenols by yeast (S-IV-1).

(a) phenol, (b) catechol, (c) resorcinol, (d) hydroquinone
total (X), respiration (O), oxidation (●)

Fig. 5 から80分時での酸素吸収量はヒドロキノン、カテコール、レゾルシン、フェノールの順である。とくにヒドロキノン40分時にも酸素吸収量が多く、前実験と一致した。カテコールは酸素吸収量が40分時にはもっとも少なかったが、80分時以後にはヒドロキノンの次に酸素吸収量を示した。

以上、ヒドロキノンがもっとも、次いでカテコールが酸化されやすく、フェノール、レゾルシンはこれらに比べ酸化されにくい傾向がみられた。根井ら⁴⁾による *Rhodotorula glutinis*, *Candida tropicalis* および *Trichosporon cutaneum* を用いた、ジヒドロキシフェノールの酸化実験の報告では、フェノールがもっとも酸化されやすく、次でヒドロキノン、レゾルシン、カテコールの順で、本実験の結果とは異なったが、これは供試菌株の異なるためと考察される。

2. 各種フェノール類縁物質添加培地における培養

S-IV-1株を各種フェノール類縁物質添加培地に培養した結果を Table 3 に示した。

Table 3 から、カテコール、レゾルシン、ヒドロキノンのようなジヒドロキシフェノールはフェノールとともに0.1%でもよく生育し、フェノール類縁物質の中では毒性は弱いと思われる。クレゾール類では *o*-異性体は0.01%で *m*- および *p*-異性体は0.05%でわずかに生育し、その毒性はフェノールやジヒドロキシフェノールより強いと思われる。メチルカテコールも *o*-異性体は0.01%で、*m*- および *p*-異性体は0.05%でわずかに生育した。アミノフェノールは *o*-異性体は0.01%で、*m*-異性体は0.05%でわずかに生育した。*p*-異性体は0.01%、0.05%でもわずかな生育を示したようだが、培地が黒濁し確認ができなかった。ニトロフェノールおよび2,4-ジニトロフェノールはクレゾール類よりもさらに毒性が強く0.01%でも生育できなかった。クロロフェノールは *o*- および *p*-異性体は0.01%でわずかに生育したが、*m*-異性体は0.01%でも生育できなかった。ブロモフェノールは *o*-異性体は0.05%で、*m*- および *p*-異性体は0.01%でわずかに生育した。ジメチルフェノールは2,3-, 2,4-および2,6-異性体が0.05%で、2,5-, 3,4-および3,5-異性体が0.01%でわずかに生育した。安息香酸は0.05%でわずかに生育した。水酸基置換安息香酸では *o*-異性体が0.05%で、*m*-異性体が0.1%でわずかな生育を示し、*p*-異性体は0.1%で適度な生育をした。ジフェニルは0.01%でわずかに生育した。水酸基置換ジフェニルでは *o*-異性体が0.01%で、*p*-異性体が0.05%でわずかな生育を示した。

以上 S-IV-1株のフェノール類縁物質の資化性については、クレゾール、メチルカテコール、アミノフェノール、水酸基置換安息香酸、水酸基置換ジフェニルでは *m*- および *p*-異性体は資化されやすく、*o*-異性体は資化されにくい傾向のあることがわかった。ジヒドロキシフェノール（カテコール、レゾルシン、ヒドロキノン）では何れも0.1%でもよく生育し、異性体による資化性の差異は本実験では認められなかった。ハロゲンフェノール（クロロフェノール、ブロモフェノール）では、*o*-異性体も *p*-異性体に劣らず資化された。なお、毒性についてはこれらの基質の中ではニトロフェノール類（ニトロフェノール、ジニトロフェノール）がもっとも

Table 3. Growth of S-IV-1 strain on various phenols.

Substrate tested	Concentration (%)		
	0.01	0.05	0.1
Phenol	+	+	+
Catechol	+	+	+
Resorcinol	+	+	+
Hydroquinone	+	+	+
<i>o</i> -Cresol	±	-	-
<i>m</i> -Cresol	±	±	-
<i>p</i> -Cresol	±	±	-
<i>o</i> -Methylcatechol	±	-	-
<i>m</i> -Methylcatechol	±	±	-
<i>p</i> -Methylcatechol	+	±	-
<i>o</i> -Aminophenol	±	-	-
<i>m</i> -Aminophenol	±	±	-
<i>p</i> -Aminophenol	±	±?	?
<i>o</i> -Nitorophenol	-	-	-
<i>m</i> -Nitorophenol	-	-	-
<i>p</i> -Nitorophenol	-	-	-
2, 4-Dinitrophenol	-	-	-
<i>o</i> -Chlorophenol	±	-	-
<i>m</i> -Chlorophenol	-	-	-
<i>p</i> -Chlorophenol	±	-	-
<i>o</i> -Bromophenol	±	±	-
<i>m</i> -Bromophenol	±	-	-
<i>p</i> -Bromophenol	±	-	-
2, 3-Dimethylphenol	±	±	-
2, 4-Dimethylphenol	±	±	-
2, 5-Dimethylphenol	±	-	-
2, 6-Dimethylphenol	+	±	-
3, 4-Dimethylphenol	±	-	-
3, 5-Dimethylphenol	±	-	-
Benzoic acid	+	±	-
<i>o</i> -Hydroxybenzoic acid	+	±	-
<i>m</i> -Hydroxybenzoic acid	+	+	±
<i>p</i> -Hydroxybenzoic acid	+	+	+
Diphenyl	±	-	-
<i>o</i> -Hydroxydiphenyl	±	-	-
<i>p</i> -Hydroxydiphenyl	±	±	-

+ Abundant growth + Moderate growth
 ± Poor growth - No growth

とも毒性が強く、次いでクロロフェノールであった。ジフェニル、水酸基置換ジフェニル、ブロモフェノール、ジメチルフェノール、アミノフェノール、メチルカテコール、クレゾールは同程度の毒性と思われる。安息香酸、水酸基置換安息香酸はフェノール類縁物質の中では毒性があまり強くない、フェノールやジヒドロキシフェノール（カテコール、レゾルシン、ヒドロ

キノン) が毒性がもっとも低いと思われる。

伊藤ら⁵⁾は *Trichosporon cutaneum* WY 2-2 による一価フェノール (フェノール, 水酸基置換安息香酸, クレゾール, ニトロフェノール, クロロフェノール) の資化実験を行い, これらの一価フェノールでは *o*-異性体が資化されにくく, *m*-, *p*-異性体が資化されやすいことを報告している。本実験では水酸基置換安息香酸とクレゾールについては *o*-異性体が資化されにくく伊藤らの報告と一致した。クロロフェノールについては *m*-異性体が資化されにくい傾向があり伊藤らの報告とは異なった結果となった。

要 約

フェノール資化性酵母 *Candida tropicalis* 6263株, X-12株, N-13株, S-IV-1株のフェノール類縁物質 (フェノール, カテコール, レゾルシン, ヒドロキノン, *p*-クレゾール) の酸化活性を検討した結果, 培地組成については, X-12株と S-IV-1株は YM 培地でも YM フェノール培地でも酸化活性にあまり差異がなかったが, *C. tropicalis* 6263株と N-13株では YM 培地で培養したものの方が酸化活性が高かった。

フェノール資化性酵母 S-IV-1株のジヒドロキシフェノールの酸化活性を検討した結果, 80分時以後は, ヒドロキノン, カテコール, レゾルシン, フェノールの順に酸化されやすいことがわかった。

S-IV-1株について36種類のフェノール類縁物質の資化性を検討した結果, 本菌はジヒドロキシフェノール, ハロゲンフェノールを除くフェノール類縁物質については, *m*-および *p*-異性体を資化しやすく, *o*-異性体は資化しにくい傾向があった。このことは伊藤ら⁵⁾による *Trichosporon cutaneum* についての報告と一致した。

文 献

- 1) 三上栄一, 福岡誠一, 小野英雄, 江藤穂積: 醸酵工, **44**, 405 (1966)
- 2) 根井仁三郎: 醸酵工, **49**, 852 (1971)
- 3) 根井仁三郎: 醸酵工, **50**, 536 (1972)
- 4) 根井仁三郎, 江夏敏郎, 照井堯造: 醸酵工, **51**, 1 (1973)
- 5) 伊藤昌雄, 藤川 昇, 亀山涼子: 農化, **53**, 329 (1979)
- 6) 伊藤昌雄, 藤川 昇: 醸酵工, **57**, 421 (1979)
- 7) 伊藤昌雄, 川口正展, 藤川 昇: 醸酵工, **57**, 429 (1979)
- 8) 赤木盛郎, 井上文夫, 倉田育子, 山田哲也: 日本農芸化学会関西支部中部支部合同大会講演要旨集, p. 10 (1979)